



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

Desarrollo de un modelo de piel en un dispositivo microfluídico (Skin-on-Chip).

Autora:

Blanca Ibáñez Herrera

Directores:

Jesús Ciriza Astrain

Sandra González Lana

Lugar de realización:

Departamento de Anatomía e Histología humanas de la Facultad de Medicina
Tissue MicroEnvironment Lab (TMElab)
Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)

Grado en BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

Septiembre 2021

ABREVIATURAS

BTF: Betransflow
MEC: Matriz extracelular
GAGs: Glicosaminoglicanos
NHEK: Queratinocitos normales epidérmicos humanos
GAGs: Qlicosaminoglicanos
SPRR3: Small proline-rich protein 3
SKALP: Skin-derived antileukoprotease
HDF: Fibroblastos dermales humanos
FBS: Suero fetal bovino
FGF2: Fibroblast growth factor 2
PBS: Phosphate buffered saline
EMEM: Eagle's Minimal Essential Medium
DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium
MTT: Bromuro de 3-(4,5,- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
P/S: Penicilina/Estreptomicina
O.C.T.: Optimal Cutting Temperatura
HE: Hematoxilina-eosina
DPX: Dibutylphthalate Polystyrene Xylene
IP: Yoduro de propidio
Heka: Human Epidermal Keratinocyte, adult

INDICE

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
2. OBJETIVOS	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. La piel	3
3.2. Modelos <i>in vitro</i> que simulen la piel evitando el uso de animales	5
- Modelo SkinEthic.....	6
- Modelo EpiSkin	7
- Modelo EpiDerm	7
3.3. Sistema microfluídico como modelo de piel	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Cultivo celular	10
4.2. Estudios de biocompatibilidad en el dispositivo Betransflow	11
4.2.1. Ensayo de contacto directo	11
4.2.2. Ensayo de contacto indirecto	12
4.2.3. Ensayo de adhesión.....	12
4.3. Gelificación del hidrogel de colágeno en el dispositivo Betransflow	12
4.4. Cultivo celular en el dispositivo microfluídico: determinación de las densidades celulares.....	13
4.4.1. Optimización de la densidad de fibroblastos (HDF)	14
4.4.2. Optimización de la densidad de queratinocitos (HaCaT)	14
4.5. Histología	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5.1. Estudios de biocompatibilidad en el dispositivo Betransflow	16
5.2. Optimización de densidades de queratinocitos (HaCaT) y fibroblastos (HDF) para el modelo de piel.....	17
5.2.1. Optimización de la densidad de HDF	17
5.2.2. Optimización de la densidad de queratinocitos	18
5.3. Histología de la dermis y epidermis	20
6. CONCLUSIONES.....	22
CONCLUSIONS.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA	24
8. ANEXOS.....	26

1. RESUMEN

La piel tiene un rol muy importante en nuestro organismo, ya que es la primera barrera que nos protege de la invasión de agentes externos. Es uno de los órganos en el que se pueden desarrollar enfermedades y lesiones, además, en ella, se muestran también los signos de envejecimiento. Por ello, la búsqueda y el desarrollo de modelos de piel es uno de los objetivos más importantes en las industrias farmacéuticas y cosméticas.

A lo largo del tiempo se han utilizado modelos animales para ensayar diferentes fármacos o cosméticos, lo que conlleva a plantearse cuestiones éticas. Además, los resultados obtenidos en animales no son completamente extrapolables a los seres humanos. Por ello, actualmente existe la necesidad de desarrollar modelos de piel humana que puedan reemplazar los modelos animales utilizados tradicionalmente.

En este trabajo, mediante el cultivo celular en un dispositivo microfluídico comercial denominado Betransflow (BTF) se pretende recrear un modelo de piel *in vitro* que mimetice las condiciones que ocurren *in vivo*, evitando el uso de animales de experimentación. En el modelo se cultivan fibroblastos humanos dermales (HDF) embebidos en una matriz de colágeno sobre la cual se siembran queratinocitos (HaCaT). Así, y como objetivo de este trabajo, previamente a la realización de dicho modelo, hemos evaluado la biocompatibilidad del dispositivo siguiendo una norma ISO, optimizando posteriormente la densidad celular de ambas líneas, fibroblastos y queratinocitos, para el desarrollo del modelo.

ABSTRACT

The skin has a very important role in our organism, since it is the first barrier that protects us from the external agents' invasion. It is one of the organs in which diseases and injuries can develop, in addition, in it, the signs of aging are also shown. Therefore, the search and development of skin models is one of the most important objectives in the pharmaceutical and cosmetic industries.

Over time, animal models have been used to test different drugs or cosmetics, which raises ethical questions. Furthermore, the results obtained in animals cannot be completely extrapolated to humans. Therefore, there is currently a need to develop human skin models that can replace traditionally used animal models.

In this work, by means of cell culture in a commercial microfluidic device called Betransflow (BTF), it is intended to recreate an *in vitro* skin model that mimics the conditions that occur *in vivo*, avoiding the use of experimental animals. In the model, human dermal fibroblasts (HDF) embedded in a collagen matrix are grown on which keratinocytes (HaCaT) are seeded. Thus, and as the objective of this work, prior to the realization of said model, we have evaluated the biocompatibility of the device following an ISO standard, subsequently optimizing the cell density of both lines, fibroblasts and keratinocytes, for the development of the model.

2.OBJETIVOS

El principal objetivo es el desarrollo de un modelo de piel en un dispositivo microfluídico Betransflow que mimetice la piel humana. Para obtener dicho modelo los objetivos específicos que se plantean en el desarrollo de este trabajo fin de grado son:

1. Caracterizar la biocompatibilidad del dispositivo bajo normas ISO.
2. Determinar la concentración óptima de fibroblastos embebidos en gel de colágeno simulando la dermis en el modelo, manteniendo la viabilidad celular.
3. Determinar la concentración óptima de queratinocitos simulando la epidermis en el modelo.
4. Evaluar histológicamente la reproducción de la dermis y la epidermis en el modelo de piel.

3.INTRODUCCIÓN

3.1. La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, creando una barrera entre el organismo y el medio exterior (Proksch et al., 2008). Entre sus principales funciones están mantener la homeostasis del medio interno, la protección y el mantenimiento de la temperatura corporal (Buendía Eisman et al., 2018). La piel posee anexos cutáneos, como el cabello y las uñas, que sirven de protección, además de las glándulas sebáceas y sudoríparas, encargadas de producir sebo (sustancia lipídica que hidrata la piel) y de la termorregulación del cuerpo, respectivamente. Aparte de la función protectora, cabe mencionar que la pigmentación y el olor desprendido por las glándulas cutáneas cumplen una función sexual y de comunicación (Meruane & Rojas, 2012).

La piel está compuesta fundamentalmente por 3 capas: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1).

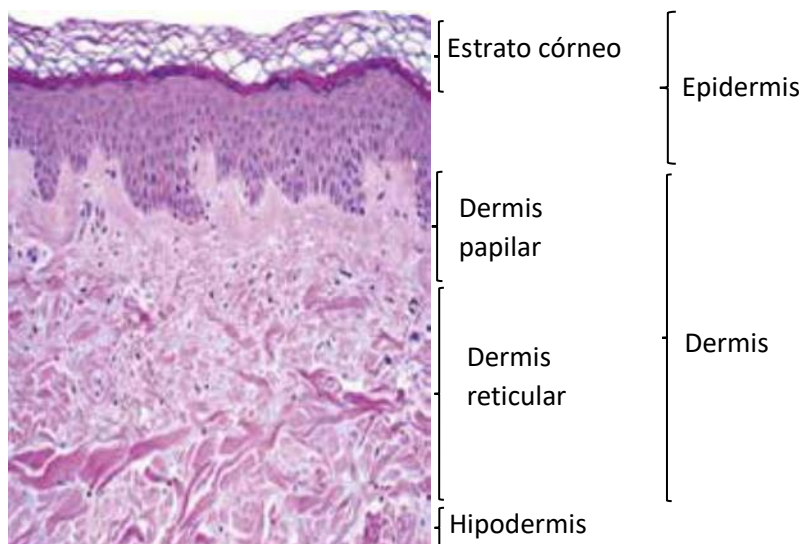


Figura 1. Corte Histológico de la piel donde se pueden observar sus diferentes capas. Imagen tomada de (Buendía Eisman et al., 2018).

La epidermis es la capa más externa y se divide en **varios estratos** debido a la progresiva diferenciación de las células. De la capa más interna a la más externa diferenciamos el estrato basal, espinoso, granuloso y córneo (Navarrete Franco, 2003) (Figura 2). Las células del **estrato basal** se asientan sobre la lámina basal (matriz extracelular que se encarga de separar el epitelio del tejido conjuntivo) y se adhieren a esta mediante las integrinas. Esta es una zona proliferativa donde se encuentran las células madre unipotentes que se dividen continuamente dando lugar al **estrato espinoso**, compuesto por varias capas de células poligonales unidas entre sí mediante desmosomas. Dependiendo de la región corporal en la que se encuentre, este estrato tendrá un número mayor o menor de capas. El **estrato granuloso** es el último estrato formado por células vivas con una morfología más plana que contienen gránulos compuestos por queratohialina (Meruane & Rojas, 2012; Navarrete Franco, 2003), en estos gránulos se encuentra principalmente la profilagrina, proteína precursora de la filagrina que cuando es activa produce la agregación y compactación de la queratina, de forma que las células de este estrato se van aplanando y transformando en las células que forman el estrato córneo (Armengot-Carbo et al., 2015). El **estrato córneo**

es el más superficial, formado por 20 - 30 capas de células muertas, planas, y anucleadas (corneocitos). Estas células se caracterizan por la presencia de queratina, una proteína hidrófoba que sustituye el citoplasma de estas, de manera que las células van aplanando más y conectando entre sí. Se produce la descamación de este último estrato, manteniendo así un grosor constante de la piel. La descamación del epitelio se produce debido a la ruptura de los desmosomas (Dorado & Fraile, 2021).

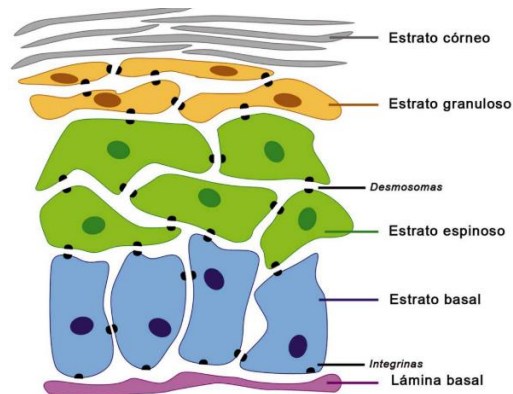


Figura 2. Diferentes estratos de la epidermis. Imagen tomada de (Meruane & Rojas, 2012).

La diferenciación y el equilibrio dinámico entre los diferentes estratos permite el remplazamiento y reparación del epitelio (Netzlaff et al., 2005).

El grosor de la epidermis varía en función de la parte del cuerpo en la que se encuentra, presentando los párpados una epidermis muy fina con un grosor aproximado de 0,03 mm mientras que en las palmas de las manos y las plantas de los pies es de 1,4 mm (Armengot-Carbo et al., 2015).

El componente principal de la epidermis son los **queratinocitos**, responsables de producir fundamentalmente queratina, además de citoquinas, prostaglandinas y factores estimulantes. En menor proporción, la epidermis está compuesta por una serie de **células dendríticas** (Campbell & Lichtensteiger, 2016):

- **Melanocitos**, encargados de producir la melanina, determinando así el color de piel. Están situados en la capa basal, donde interaccionan con los queratinocitos, siendo capaces de transferirles a estos la pigmentación.
- **Células de Merkel**, localizadas en la capa basal, presentan función mecanorreceptora.
- **Células de Langerhans**, procedentes de la médula ósea, pero situadas en la zona basal. Están involucradas en respuesta inmune, ya que son células presentadoras de antígenos.

La dermis es un tejido fibro-elástico situado por debajo de la epidermis. Está formado por tejido conectivo (red de colágeno, fibras elásticas y reticulares) y diversos tipos celulares, principalmente fibroblastos. Diferenciamos dos regiones (Figura 1) (Dorado & Fraile, 2021; Navarrete Franco, 2003):

- El **estrato papilar** es la parte superior de la dermis, compuesta por tejido conectivo laxo con numerosos fibroblastos embebidos en una matriz de colágeno compuesta por fibras finas y poco compactas. Su nombre viene dado porque esta capa está compuesta en su mayoría por papilas dérmicas o crestas de Rete, que son invaginaciones de la dermis en la epidermis.
- El **estrato reticular o dermis profunda** es la parte inferior y es más gruesa que el estrato anterior, donde las fibras de colágeno son más gruesas y contiene menos fibroblastos. Además, en esta también podemos encontrar adipocitos, folículos pilosos, nervios, glándulas sebáceas y sudoríparas.

Una de las principales funciones de la dermis es nutrir a la epidermis, ya que esta última no está irrigada por vasos sanguíneos. Aunque la dermis posee vasos linfáticos, folículos capilares, nervios y glándulas sebáceas y sudoríparas, los fibroblastos son el tipo celular más prevalente que se encuentran en el tejido conectivo (dermis) de la piel (*Fibroblasto* | NHGRI, n.d.). Juegan un papel importante en la cicatrización, ya que son capaces de secretar varios componentes de la matriz extracelular (MEC), como colágeno, fibrina, fibronectina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos. La MEC constituye un microentorno que influye sobre la proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, senescencia y expresión de genes de las células que se encuentran embebidas en ella, siendo los fibroblastos un tipo celular dinámico y muy ligado a la MEC, pudiendo modular las propiedades de ésta. Los fibroblastos producen principalmente colágeno tipo I y III, secretando mayor o menor cantidad en función de su localización, siendo menor en la dermis más profunda que en las capas más superficiales de la dermis.

Los componentes de la matriz extracelular de la piel (Tracy et al., 2016), podemos dividirlos en:

- **Moléculas que forman fibras estructurales**, creando un complejo tridimensional de proteínas rígidas que dan una estructura firme y elástica a la MEC. Algún ejemplo de estas son el colágeno, la fibrina, fibronectina y elastina. Hay diversos tipos de colágeno, pero el colágeno I y III componen aproximadamente un 90% y un 10% del colágeno total presente en la piel, respectivamente.
- **Moléculas que no forman fibras estructurales**, como los proteoglicanos (ácido hialurónico) y los glicosaminoglicanos (GAGs) (condroitín y dermatán sulfato). Son moléculas cargadas negativamente, osmóticamente activas y se localizan en el espacio intersticial cuya función es la hidratación de la matriz.

Por último, la hipodermis es la capa más interna de la piel y está formada principalmente por una red de colágeno, células adiposas y vasos sanguíneos. Su principal función es el mantenimiento del calor corporal, el almacenamiento de energía y la irrigación de las capas superiores de la piel para la aportación de nutrientes y oxígeno y la eliminación de desechos (Khavkin & Ellis, 2011).

3.2. Modelos *in vitro* que simulen la piel evitando el uso de animales

Tradicionalmente, los ensayos para evaluar medicamentos o cosméticos se han realizado sobre animales, como ratas, ratones, conejos o cobayas (Romero-Fernandez et al., 2016). Estos son un buen modelo ya que representan un sistema biológico complejo, integrado y dinámico donde se puede estudiar el desarrollo de una enfermedad, así como las interacciones que se producen entre fármacos y los diferentes órganos y tejidos del cuerpo. Sin embargo, el uso de animales de experimentación presenta problemas éticos ya que son seres vivos que sienten dolor y sufren, por lo que está muy regulado legalmente. Además, los resultados obtenidos en animales no son completamente extrapolables a los seres humanos, por eso, en algunas ocasiones, se retiran medicamentos en las fases de prueba más avanzadas. Una de las grandes diferencias en muchos de los animales modelo es el grosor de la piel, que no es comparable con la del ser humano, siendo la piel del cerdo, en este aspecto, similar a la nuestra. Por otro lado, los ratones tienen una capa muscular adicional, *Panniculus carnosus*, que permite la cicatrización de heridas por contracción, sin dejar cicatriz, a

diferencia de los humanos que la cicatrización se produce por reepitelización. Otra de las diferencias es que la mayoría de estos animales, como el conejo o ratón, poseen pelaje, mientras que los humanos no (*Top Differences between Human and Animal Skin* / Genoskin, n.d.).

Los estudios con animales siguen el principio de las tres R (reemplazar, reducir y refinar) establecido en 1959 por Russell y Burch (Martínez-Hidalgo, 2007). Con este principio se pretende usar otras técnicas alternativas de experimentación que no impliquen seres vivos, usar un menor número de individuos animales e intentar disminuir su sufrimiento refinando las técnicas utilizadas.

Así, para reducir el número de animales utilizados en experimentación, los modelos matemáticos junto a simulaciones computacionales (modelos *in silico*) permiten cribar el número de sujetos de experimentación necesarios en los ensayos con fármacos. Los estudios con cultivos celulares que simulen tejidos u órganos (modelos *in vitro*) también permiten rebajar la cantidad de animales usados en los laboratorios. En el caso de la piel, los modelos *in vitro* deben ser muy similares a la piel humana, reproduciendo lo más fielmente las condiciones fisiológicas del tejido para poder realizar sobre ellos ensayos que sean fiables (Fina et al., 2013). En este campo se han desarrollado varios modelos *in vitro* comerciales, como por ejemplo SkinEthic, EpiSkin y EpiDerm los cuales simulan la epidermis humana (Poniec et al., 2002).

En estos modelos que se describen a continuación se ha generado una interfaz aire-líquido. De esta manera, los queratinocitos están expuestos directamente al oxígeno del aire, que promueve la diferenciación de estos, expresándose marcadores propios de cada estrato (Pruniéras et al., 1983). Por el contrario, en cultivo en medio líquido estos no se diferenciarían (Benny et al., 2016).

- Modelo SkinEthic

El modelo SkinEthic recrea la epidermis con queratinocitos formando el estrato córneo, granuloso y espinoso de la piel humana (Figura 3). Han identificado desmosomas, gránulos de queratohialina y cuerpos lamelares (orgánulos secretores) en el modelo. Sin embargo, SkinEthic difiere del tejido nativo humano en que a lo largo de sus capas epidérmicas se encuentran gotas lipídicas.

En el estrato córneo de la piel se encuentran principalmente las ceramidas y en las células epidérmicas predominan los fosfolípidos. En la epidermis nativa el estrato córneo, debido a su descamación, tiene un espesor constante, por lo que la relación ceramidas/fosfolípidos es constante. Sin embargo, al no haber descamación en el modelo SkinEthic su grosor va creciendo, aumentando así la relación ceramidas/fosfolípidos. En general, la composición lipídica del modelo se aproxima a la composición del tejido nativo. En este se detecta la expresión de marcadores bioquímicos indicativos de procesos de diferenciación no presentes en la piel nativa, como queratina 6 y SKALP (inhibidor de una serin-proteasa epitelial con función antiinflamatoria presente en epidermis con psoriasis y en heridas en proceso de curación). Sin embargo, tanto en el modelo SkinEthic como en la epidermis nativa están presentes las proteínas precursoras del estrato córneo, loricrina e involucrina, que son sustrato de una transglutaminasa también presente, encargada de hacer un crosslinking entre ellas en los estadios finales de la queratinización. El modelo SkinEthic se utiliza para hacer habitualmente ensayos de fototoxicidad, de irritación y de permeabilidad (Poniec et al., 2002).

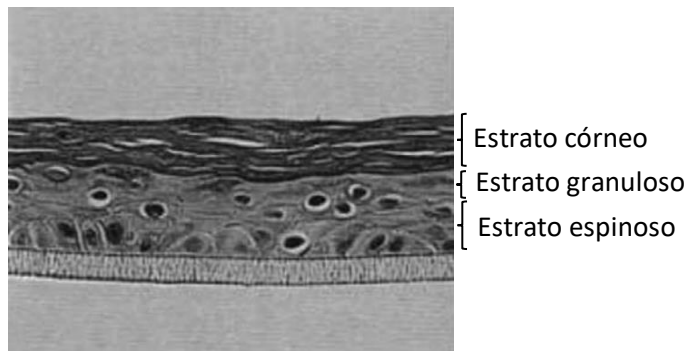


Figura 3. Morfología del modelo SkinEthic. Imagen tomada de (Ponec et al., 2002).

- Modelo EpiSkin

Este modelo *in vitro* consiste en una matriz de colágeno bovino tipo I cubierta con colágeno humano tipo IV, recreando la dermis. Sobre esta matriz se cultiva una capa de queratinocitos humanos, generando una epidermis estratificada. Hay dos tipos de modelo EpiSkin, uno usado para hacer ensayos de irritación y otro para realizar ensayos de permeabilidad de diferentes sustancias, siendo el segundo modelo más compacto y grueso, es decir, este cuenta con un número mayor de capas de células, en concreto entre 7 y 10 capas, que el modelo usado para los ensayos de irritabilidad, que posee 7 capas (Figura 4). La estructura lipídica del modelo de irritación tiene una composición de fosfolípidos similar a la piel natural, mientras que en el modelo de permeabilidad la cantidad de fosfolípidos es menor. Sin embargo, en ambos modelos la proporción de di/triglicéridos es mucho mayor (21%) que en la piel nativa (9%), mientras que la cantidad de ácidos grasos libres y de esteres de colesterol son menores. También existen diferencias en los marcadores bioquímicos entre ambos modelos, con expresión de loricrina en el modelo de irritación y ausencia en el de permeabilidad (Ponec et al., 2002).

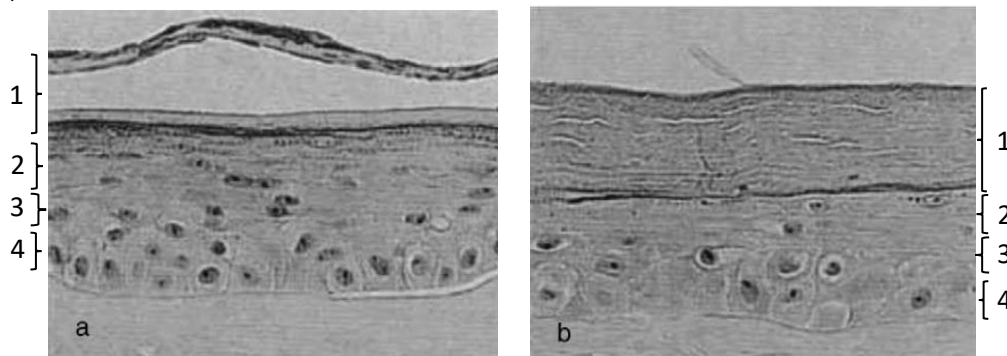


Figura 4. La imagen a) representa la morfología del modelo de irritación EpiSkin y la b) representa la morfología del modelo de permeabilidad SkinEthic. El número 1, 2, 3 y 4 indican el estrato córneo, el granuloso, espinoso y basal, respectivamente. Imagen tomada de (Ponec et al., 2002).

- Modelo EpiDerm

Este modelo está formado por queratinocitos normales epidérmicos humanos (NHEK) que se han cultivado hasta formar una multicapa. Estos queratinocitos se diferencian de forma muy similar a la piel humana, presentando estrato basal, espinoso, granuloso y córneo (Figura 5). Al igual que el modelo EpiSkin, presenta un modelo para ensayos de permeabilidad y otro para irritación. Como sucedía en el modelo SkinEthic, a lo largo de sus capas epidérmicas existen gotas lipídicas. El perfil lipídico del modelo EpiDerm es similar al de la epidermis natural, aunque con una cantidad más elevada de

glucosilceramidas y menor de colesterol y ácidos grasos libres. Respecto a marcadores bioquímicos, en ambos modelos de irritación y penetración se expresa involucrina y loricrina, pero SPRR3 (Small proline-rich protein 3) únicamente se expresa en el estrato granuloso del modelo de irritación (MatTek Life Sciences, n.d.; Poniec et al., 2002).

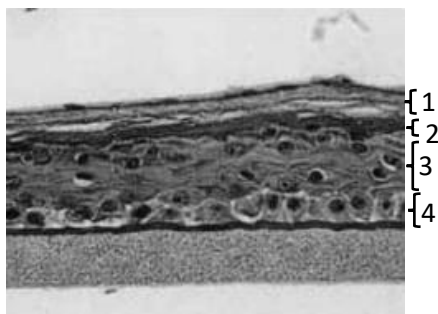


Figura 5. Morfología del modelo de permeabilidad EpiDerm. El número 1, 2, 3 y 4 indican el estrato córneo, el granuloso, espinoso y basal, respectivamente. Imagen tomada de (Poniec et al., 2002).

La estructura general, los componentes y la bioquímica de los tres modelos descritos reproducen de forma cercana la piel humana. Sin embargo, tienen sus limitaciones. Por ejemplo, la permeabilidad de sustancias a través de estos modelos *in vitro* es elevada en comparación con la piel humana, además de no representar la variabilidad de permeabilidad en la piel humana. Asimismo, la barrera creada en estos modelos es débil, lo que afecta también a los resultados obtenidos. Estas diferencias con la piel podrían deberse entre otras razones a la alteración en la descamación y/o la presencia de alguna zona microscópica no queratinizada. Por otro lado, algunos de estos modelos no recrean la dermis, la cual actúa como barrera que frena la permeabilidad de sustancias lipofílicas. Otras limitaciones a tener en cuenta son la falta de reproducción de la vasculatura irrigando la dermis, cuya labor, entre otras, es la de expulsar las sustancias que penetran a través de la piel.

3.3. Sistema microfluídico como modelo de piel

Actualmente, los cultivos *in vitro* tradicionales no son capaces de representar completamente todas las condiciones de los tejidos *in vivo*, por lo que surge la necesidad de utilizar modelos más representativos. Gracias a la miniaturización, se han creado dispositivos microfluídicos o chips que se utilizan como plataformas para cultivo celular. Se trata de unos dispositivos compartimentalizados en un conjunto de cámaras y canales que permiten alojar uno o varios tipos celulares de manera ordenada. Además, estos sistemas permiten la aplicación de diversos estímulos físico-químicos, como el flujo del medio de cultivo, que tratará de imitar el flujo de la sangre a través de un vaso sanguíneo que irriga un tejido biológico. Este flujo causa un estrés mecánico (*shear stress*) que tiene un impacto directo por contacto con células e indirecto mediante la generación de gradientes de oxígeno y nutrientes que provocan fenómenos como la migración o la diferenciación celular. De este modo, se generan cultivos complejos que consiguen simular la microarquitectura de un órgano o tejido.

El modelo que se plantea en este proyecto se basa en recrear la dermis y la epidermis de la piel humana. Se ha utilizado el dispositivo microfluídico denominado Betransflow (BTF), fabricado por la empresa BEOnChip S.L. El dispositivo BTF presenta dos canales independientes a través de los cuales fluirá el medio de cultivo. Estos canales conectan con los pocillos de carga y descarga (inlet/outlet), por los que se aplicará dicho medio. Además, estos pocillos están adaptados para conectarlos con

elementos fluidicos. Sobre cada canal se localiza un pocillo central (6x5'7x5'7mm) separado del canal por una membrana porosa (policarbonato) de 1 μm de tamaño de poro (*Technology | BEOOnChip – Biomimetic Environment On Chip*, n.d.). Entre los pocillos de carga y descarga se encuentra un pocillo reservorio que se rellena de PBS o agua para evitar la evaporación del medio de cultivo depositado en el sistema (Figura 6).

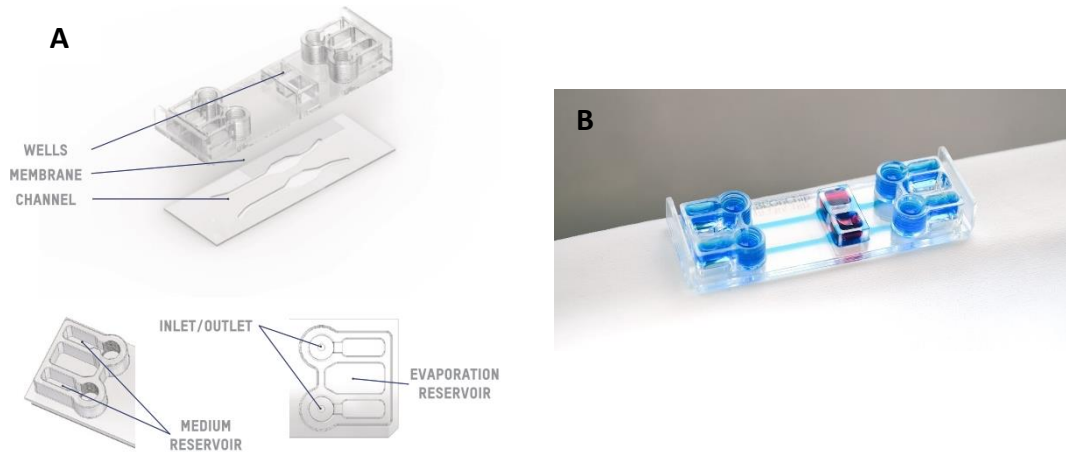


Figura 6. A) Esquema de las partes del dispositivo Betransflow. B) Dispositivo Betransflow. En rojo, los pocillos centrales donde se siembran las células. En azul, los canales y los pocillos inlet y outlet. Imagen tomada de (*Technology | BEOOnChip – Biomimetic Environment On Chip*, n.d.).

El material con el que se fabrica el dispositivo BTF es COP (polímero de olefina cíclica) y ha sido tratado para obtener una superficie hidrofílica, promoviendo así la adhesión celular. Este material tiene buena resistencia térmica y mecánica. Además, gracias a su transparencia y su baja autofluorescencia posee buenas propiedades ópticas para realizar ensayos que impliquen el uso de microscopios de fluorescencia, confocal o de contraste de fases. También es posible realizar experimentos de hipoxia en estos chips ya que el material con el que están formados presenta una permeabilidad muy baja del oxígeno y del vapor de agua. Asimismo, este dispositivo permite generar una interfaz aire líquido (Figura 7 A) (*Technology | BEOOnChip – Biomimetic Environment On Chip*, n.d.).

En los pocillos centrales es posible sembrar las células en monocapa o embebidas en un hidrogel (Figura 7), de forma que el medio de cultivo que nutrirá a las células se introduce en el sistema por el pocillo de carga, fluyendo por el canal y saliendo por el pocillo de descarga.

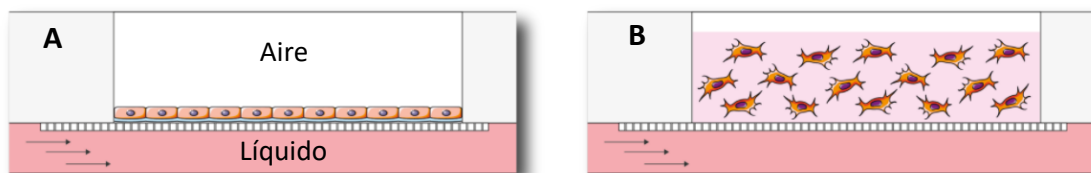


Figura 7. Células sembradas sobre la membrana de los pocillos centrales. La imagen A muestra las células sembradas en monocapa y en la imagen B se observan las células embebidas en un hidrogel. Imagen tomada de (*Technology | BEOOnChip – Biomimetic Environment On Chip*, n.d.).

El objetivo a largo plazo, es implementar al modelo el flujo del medio de cultivo con la ayuda de un sistema de perfusión.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas fueron HDF (Human Dermal Fibroblasts) cedidos por la doctora Aránzazu González Miqueo y HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente, Elabscience, cat number EP-CL-0090).

Para el mantenimiento de los HDF se usó medio completo compuesto por DMEM bajo en glucosa (1mg/ml) (Dulbecco Modified Eagle Medium) (Lonza, 12-707F), 1% P/S (Penicilina/Estreptomicina) (Lonza, DE 17-602E), 10% suero fetal bovino (FBS) (Sigma, F7524), 1% glutamina (Lonza, 17-605C) y el factor de crecimiento FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) a una concentración de 10ng/ml (Stock a 100 µg/ml) (Peprotech, 100-18B). Para las células HaCaT se utilizó medio D10 cuya composición es la misma que el medio completo excluyendo el FGF2.

Inicialmente, ambas líneas celulares estaban congeladas en criotubos conservados en nitrógeno líquido. El método de descongelación de las células fue diluir el mililitro procedente del criotubo en 9 ml de medio de cultivo D10 sobre un tubo de centrifuga de 15 ml. De esta manera, la concentración del DMSO disminuye considerablemente, evitando así que ejerza su toxicidad a temperatura ambiente. Tras centrifugar 5 minutos a 1200 rpm, el pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo para posteriormente sembrarlas en un flask T25 o T75 según la densidad celular que se quiera obtener. Ambos tipos celulares se mantuvieron cultivados en un incubador húmedo a 37°C con un 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada 2 días y realizando un pase cuando estos alcanzaban confluencia de 80-90%.

Para los pases celulares, se retiró el medio de cultivo del flask confluyente mediante aspiración, se lavó la superficie con PBS para eliminar el medio de cultivo sobrante, que inhibe la tripsina. A continuación, se añadió tripsina (Cultek, 17-161E) y se incubó el flask durante 3-4 minutos a 37°C. Se neutralizó la tripsina con un volumen 10 veces mayor de medio para inhibir el efecto proteolítico de esta. Posteriormente, se trasvasó la suspensión celular obtenida a un tubo de centrifuga de 15ml para centrifugarlo a 1200 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo.

Para obtener la concentración celular (células/mililitro) del cultivo tripsinizado se realizó el recuento mediante la cámara de Neubauer. Para ello, se cargó 10 µl de muestra diluida en la cámara y se contaron las células presentes en los 4 cuadrantes exteriores de la cámara. Haciendo uso de la siguiente fórmula se obtiene la concentración celular:

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{N^{\circ} \text{cél}}{\text{ml}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{cél} \times 10^4 \text{ml} \times \text{factor de dilución}}{N^{\circ} \text{cuadrantes contados}}$$

Una vez conocida la concentración de la suspensión celular, se puede determinar el volumen necesario que hay que tomar de esta para obtener un número de células concreto.

4.2. Estudios de biocompatibilidad en el dispositivo Betransflow

Este estudio se basa en evaluar la biocompatibilidad del material con el que está fabricado el dispositivo BTF. La citotoxicidad de los dispositivos se evaluó siguiendo la normativa ISO 10993-5 en la que establecen los experimentos y protocolos a seguir, el tipo celular a usar (Fibroblastos L929) y su densidad (3.125×10^4 cel/cm²). Para la determinación de la biocompatibilidad es necesario realizar tres tipos de ensayos:

- Ensayo de contacto directo.
- Ensayo contacto indirecto.
- Ensayo de adhesión.

Los fibroblastos L929 (cedido por Dr. Pedraz, UPV-EHU) se cultivaron en el medio EMEM suplementado con un 10% de FBS, 1% de P/S y 4mM de L-glutamina en el incubador a 37°C con un 5% de CO₂.

Como control negativo de los ensayos se realizaron cultivos en placas de poliestireno de 96 pocillos ya que el área de los pocillos del BTF es la misma que la de los pocillos de dichas placas (32,49 mm²). El poliestireno es un material que según la normativa ISO 10993 no produce respuesta citotóxica.

Las medias de los resultados fueron comparadas mediante ANOVA, test de Tukey, considerando significativo cuando $p < 0.05$.

4.2.1. Ensayo de contacto directo

Este ensayo se basa en exponer directamente los fibroblastos sobre la membrana porosa que conforma la base de los pocillos centrales del dispositivo BTF. Posteriormente, se evaluará la viabilidad celular, relacionada con la citotoxicidad del chip, mediante bromuro de 3-(4,5,- dimetiltilazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT). El MTT es un indicador de la funcionalidad mitocondrial y por tanto de la viabilidad celular, mediante colorimetría. Este reactivo será reducido por la succinato deshidrogenasa mitocondrial a un compuesto coloreado insoluble de color azul (formazán) por las células viables (Figura 8). La cuantificación del formazán, por tanto, será un indicador indirecto de la viabilidad celular.

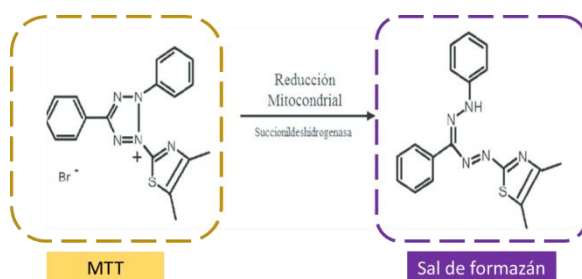


Figura 8. Reacción de reducción del MTT. El MTT antes de ser procesado por la enzima es de color amarillento y tras su reducción adquiere un color azul/morado. Imagen tomada de (Ferraro, n.d.).

En la placa de 96 pocillos se emplearon 4 pocillos en los que se pipetearon 100 µl de la suspensión celular de densidad 1×10^5 cel/ml a modo de control negativo. Como blanco del experimento sobre otros 4 pocillos se pipetearon 100 µl de medio de cultivo. Respecto al dispositivo BTF se sembraron 4 pocillos con 100 µl de la suspensión celular de densidad 1×10^5 cel/ml. Por último, se incubó tanto la placa como los chips **durante 24h** (37°C, 5%CO₂) con el objetivo de obtener una monocapa de células.

Tras el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se procedió a realizar el ensayo con el MTT. Para todas las condiciones se añadió 10 µl de MTT junto a 100 µl

de medio de cultivo. Tras 2 horas de incubación (37°C, 5%CO₂) se disolvieron los cristales de formazán formados pipeteando 100 µl de la solución de solubilización del MTT (Sigma, TOX1-1KT). Una vez disueltos, se cuantificó el color midiendo la absorbancia a 570 nm tomando como referencia la longitud de onda de 690 nm.

4.2.2. Ensayo de contacto indirecto

Este ensayo se basa en cuantificar la posible toxicidad liberada por el dispositivo al medio de cultivo tras su incubación **durante 24h**, obteniendo así el medio de cultivo condicionado (medio de cultivo + compuestos tóxicos liberados por el BTF). Este medio condicionado se utilizará para cultivar las células en la placa de 96 pocillos y obtener su viabilidad con el ensayo de toxicidad del MTT.

Se sembraron L929 a una densidad de 1×10^5 cel/ml en los pocillos de la placa de 96. **Tras 24h** se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl de medio de cultivo condicionado a 4 pocillos. En este experimento el control negativo fueron 4 pocillos sembrados con células cultivadas con 100 µl de medio de cultivo no condicionado y la condición blanco fueron 4 pocillos sin células en el que se pipetearon 100 µl medio de cultivo no condicionado. Tras 24h (37°C, 5% CO₂) se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl de medio de cultivo y 10 µl de la solución de MTT. Se incubó durante 2h (37°C, 5% CO₂) y, a continuación, se disolvieron los cristales de formazán formados con la solución de solubilización del MTT para poder llevar a cabo la cuantificación colorimétrica mediante un lector de placas configurado con el filtro de 570 nm (longitud de onda de referencia de 690 nm).

4.2.3. Ensayo de adhesión

Este ensayo trata de comparar la adhesión celular obtenida en los pocillos de la placa de 96 pocillos con el dispositivo BTF.

Siguiendo el protocolo del ensayo directo, después de sembrar L929 a una concentración de 1×10^5 cel/ml y obtener una monocapa celular, se incubaron los pocillos en los que están sembradas las células y los pocillos blanco **durante 4h** (37°C, 5%CO₂). Se retiró el medio de cultivo y pipetearon 10 µl de MTT junto a 100 µl de medio de cultivo y se incubó durante 2h (37°C, 5%CO₂) para la formación de los cristales de formazán. Por último, se disolvieron los cristales y se cuantificó el color obtenido mediante el lector de placas a una longitud de onda de 570 nm (longitud de onda de referencia de 690 nm).

4.3. Gelificación del hidrogel de colágeno en el dispositivo Betransflow

Para recrear la dermis, los HDF son embebidos en una matriz de colágeno. Debido a la tensión superficial ejercida por el propio material que forma el pocillo, se forma un menisco que impide la formación de una monocapa uniforme cuando se siembran los queratinocitos sobre el hidrogel (Figura 9 A). Para subsanar este problema, se han impreso mediante impresión 3D adaptadores de resina (Figura 9 B) (Clear Resin 1 Lm Formlab) de fondo plano que se encajan en los pocillos en los que se siembra el hidrogel de colágeno (Figura 9 C).

Los adaptadores usados han sido optimizados y tienen una altura de 3 mm y su anchura está comprendida entre un rango de 5.26 mm - 5.37 mm. Además, estos cuentan con un agujero en una esquina cuya función es purgar el aire que queda dentro del pocillo al poner sobre él el adaptador.

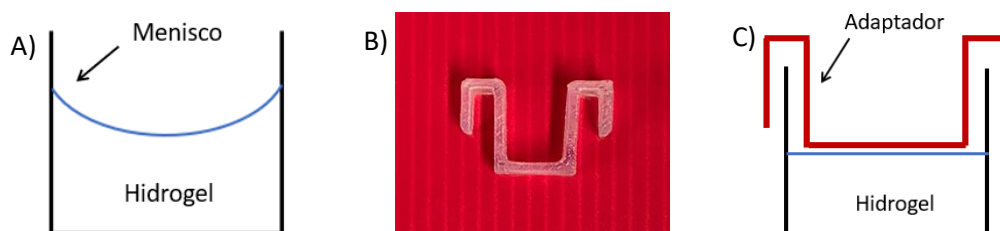


Figura 9. A) Representación del menisco formado por el hidrogel en el pocillo del BTF. B) Forma de los adaptadores impresos. C) Esquema de la posición en la que se coloca el adaptador en el pocillo del dispositivo BTF, quedando plano el hidrogel.

Dado que se trabaja con células se aplican condiciones de esterilidad. Los adaptadores fueron autoclavados previamente, algo necesario para evitar su adherencia con el hidrogel de colágeno.

Además, tras su esterilización, fueron tratados con una solución antiadherente (Stemcell technologies, 07010) para evitar que el hidrogel se adhiriera al adaptador y se despegue del pocillo al retirarlo tras su polimerización.

En la preparación del hidrogel es importante tener todos los reactivos en hielo para evitar la rápida polimerización del colágeno a temperatura ambiente. El hidrogel está compuesto por colágeno tipo I de cola de rata, DMEM 5X, NaOH 1N y agua destilada autoclavada. El volumen de los reactivos necesario para realizar el hidrogel depende del volumen final del hidrogel (V_f), de la concentración stock de colágeno (C_{stock}) y de la concentración final deseada del hidrogel (C_f). El stock de colágeno está a una concentración de 9,29 mg/ml (Corning, 10224442). Mediante las fórmulas del Anexo I se obtiene el volumen necesario de cada reactivo.

Los volúmenes calculados se pipetearon en un eppendorf en orden: agua, DMEM 5X, NaOH 1N, colágeno y la suspensión celular. Se homogeneizó bien la muestra y se cargaron 50 μ l de hidrogel de colágeno en cada pocillo. Posteriormente, se colocó el adaptador sobre los pocillos y se volteó el chip cada 20 segundos durante 5 minutos para que los fibroblastos se distribuyeran uniformemente a lo largo del eje Z del hidrogel. Para la completa polimerización del gel se incubaron los chips durante 30 minutos (37°C, 5%CO₂).

4.4. Cultivo celular en el dispositivo microfluídico: determinación de las densidades celulares

Las líneas celulares de fibroblastos (HDF) y queratinocitos (HaCaT) se cultivaron en el dispositivo BTF con el objetivo de realizar un cultivo organotípico que simule un modelo de piel. Se recrearon 2 condiciones:

- **Dermis.** Fibroblastos dermales humanos embebidos en un hidrogel de colágeno sembrados en el pocillo.

- **Epidermis.** Queratinocitos HaCaT sembrados sobre la membrana del pocillo del chip, representando únicamente la epidermis.

A todos los cultivos sembrados en el dispositivo BTF se les añadió medio de cultivo DG10 (DMEM alto en glucosa (4,5 mg/ml) y 10% FBS), suplementado con L-ácido ascórbico (vitamina C) a una concentración 50 μ g/ml (SIGMA Life Science SLBB4446V), agente que promueve la diferenciación de los queratinocitos (Schoop et al., 1999).

Para el cultivo de HDF se sembraron 50 μ l de hidrogel en el pocillo central del BTF con la densidad celular requerida en cada caso.

Las células HaCaT se sembraron también en volúmenes de 50 μ l de suspensión celular por pocillo a la densidad celular deseada. Con los chips ya sembrados en las diferentes condiciones, se añadieron 300 μ l de medio DG10 suplementado con vitamina C por los pocillos de carga y 50 μ l sobre los pocillos en los que se habían sembrado las células. Por último, se rellenó el pocillo reservorio con PBS para evitar la evaporación del medio de cultivo y se mantienen en el incubador (37°C, 5%CO₂).

Para determinar la densidad óptima de ambos tipos celulares se realizaron ensayos de viabilidad celular tras 14 días de cultivo, dejando en el caso de los queratinocitos a partir del cuarto día un cultivo aire-líquido.

El objetivo de este ensayo es optimizar el número de fibroblastos y queratinocitos requeridos en el modelo de piel recreado en el chip que sea comparable con las condiciones fisiológicas de la piel.

4.4.1. Optimización de la densidad de fibroblastos (HDF)

La motivación de la búsqueda de la densidad óptima de fibroblastos tiene origen en la capacidad contráctil de los HDF (Zhu et al., 2001). Debido a ello son capaces de contraer el hidrogel de colágeno en el que están embebidos provocando el despegue de este del pocillo del chip. De esta manera no sería posible la generación de la interfaz aire-líquido, ya que el medio de cultivo pasaría del canal inferior al pocillo central a través de la membrana porosa.

Se cultivaron diferentes densidades de HDF: **4x10⁵ cel/ml**, **2x10⁵ cel/ml**, y **3x10⁴ cel/ml** para observar cuál de estas no produce contracción del hidrogel tras 14 días de siembra. Se prepararon hidrogeles de colágeno con las densidades de fibroblastos deseadas siguiendo el protocolo mencionado en el punto 4.3. En el pocillo se pipeteó 50 μ l de hidrogel que fue aplanado gracias al uso de los adaptadores. Se cambió el medio de cultivo tanto de los canales como del pocillo donde estaban las células sembradas todos los días.

Tras 14 días de siembra, se realizó una tinción fluorescente de viabilidad con calceína (Life Technologies, C1430), que marca en verde (λ_{ex} =495 nm, λ_{em} =515 nm) el citoplasma de las células vivas tras su procesamiento por esterillas del interior celular; y yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich P4170), que marca en rojo (λ_{ex} =535 nm, λ_{em} =615 nm) las células muertas dado que no puede penetrar en las células que están intactas, tiñendo así el núcleo al intercalarse entre las hebras de ADN. Se visualizaron las células mediante microscopía de fluorescencia.

Tras un lavado del chip con PBS, se añadió a los canales (200 μ l) y al pocillo (100 μ l) una solución de calceína (1x10⁻³ mg/ml) e IP (4x10⁻³ mg/ml) en PBS. Por último, se incubó durante 30 minutos (37°C, 5%CO₂) protegido de la luz.

4.4.2. Optimización de la densidad de queratinocitos (HaCaT)

En este ensayo se sembraron densidades de queratinocitos de **6x10⁶ cel/ml**, **1,5x10⁷ cel/ml** y **2x10⁷ cel/ml**. La densidad óptima será aquella que es capaz de formar una monocapa impermeable tras 4 días de siembra para después formar las diferentes capas de la epidermis en una franja de tiempo de 10 a 13 días.

Tras sembrar sobre la membrana del chip las densidades deseadas de queratinocitos, se cultivaron los chips (37°C, 5% CO₂) sobre un balancín. De esta manera, el medio de cultivo consumido por las células en la parte del canal inferior del pocillo donde estas están sembradas no queda estancado y se desplaza de un reservorio a otro, renovándose con el movimiento del balancín (Figura 10).

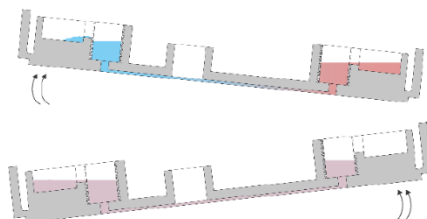


Figura 10. Representación de un corte transversal de un chip en un balancín donde se muestra la renovación del medio de cultivo gracias al movimiento. Imagen tomada de (Technology | BEOChip – Biomimetic Environment On Chip, n.d.)

Se renovó el medio de cultivo todos los días, en este caso DG10 suplementado con ácido ascórbico. En los primeros 4 días (periodo en el que se genera la monocapa impermeable) se retiró cuidadosamente el medio de cultivo de los pocillos y de los canales del chip. Tras cuatro días, se retiró el medio de cultivo de los pocillos en los que se han sembrado las células para generar la interfaz aire-líquido. Si se ha formado correctamente una monocapa impermeable, el pocillo no se rellenará de medio de cultivo procedente del canal inferior. Tras generar dicha interfaz, se cambió el medio de cultivo del canal inferior todos los días. Al igual que en el caso de los HDF, se realizó la tinción calceína-IP.

4.5. Histología

Con este ensayo se pretende conocer la histología de la epidermis y de la dermis recreada en el dispositivo BTF. Con ello se puede identificar las diferentes capas originadas por las células y observar la morfología y disposición de estas. Para ello, se realizaron cortes histológicos con el criostato Leica CM1850 tras 18 días de siembra en el pocillo del dispositivo BTF y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE).

Para realizar el corte con el criostato se extrajo la muestra del pocillo con la ayuda de un bisturí y pinzas. Una vez aislada, se depositó en un criomolde en el que previamente se había vertido la solución O.C.T. (LABOLAN, 4583), para posteriormente cubrir completamente con O.C.T. Con la muestra ya preparada se procedió a realizar cortes histológicos con el criostato a 10 µm de espesor y a una temperatura de -20°C.

Los cortes de 10 µm se colocaron sobre un portaobjetos y se realizó la tinción de hematoxilina eosina. Para llevar a cabo esta tinción el procedimiento que se siguió fue poner en contacto con hematoxilina el portaobjetos con el corte histológico durante 15 minutos, tras ello se sumergió en agua para eliminar el exceso de colorante, se puso en contacto durante 20 segundos con eosina y se lavó de nuevo con agua. A continuación, se hicieron 4 lavados consecutivos de 3 segundos en alcohol de 60°, 90°, 100° y 100° para eliminar el agua. Por último, se realizaron dos inmersiones en xileno, agente limpiador que aclara la muestra. Antes de visualizar la muestra con el microscopio óptico se fijó el cubreobjetos sobre el portaobjetos con DPX (Dibutylphthalate Polystyrene Xylene), un medio de montaje no acuoso para microscopía.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudios de biocompatibilidad en el dispositivo Betransflow

En el **ensayo de contacto directo**, tras disolver los cristales de formazán y medir la absorbancia a 570 nm (longitud de onda de referencia 640 nm), se mostró una reducción de la viabilidad de las células que estaban creciendo en el dispositivo BTF comparándola con el control en placa (Figura 11). Sin embargo, la viabilidad que se obtuvo en el dispositivo BTF fue mayor del 70%. Como se ha mencionado anteriormente, este ensayo se rige por la norma ISO 10993-5, la cual considera que al obtener un porcentaje de viabilidad superior al 70%, comparado con el control, el dispositivo BTF no tiene potencial citotóxico sobre los fibroblastos L929 sembrados en él.

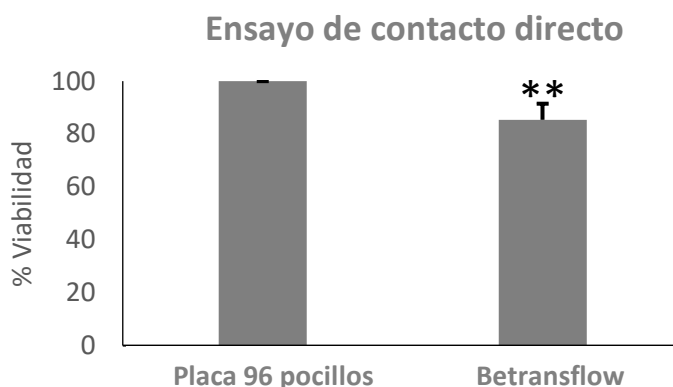


Figura 11. Comparación de la viabilidad celular entre la placa de 96 pocillos y el dispositivo Betransflow en el ensayo de contacto directo.

En el **ensayo de contacto indirecto**, tras cuantificar el color de los cristales de formazán disueltos, se comparó la viabilidad de las células cultivadas con el medio condicionado frente a células cultivadas con medio no condicionado. La reducción de la viabilidad que se obtuvo no fue significativa (Figura 12), lo que indica que el medio condicionado no tiene potencial citotóxico.

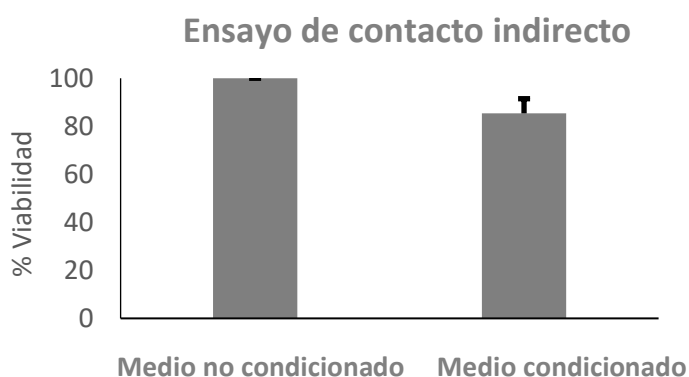


Figura 12. Comparación de la viabilidad celular de las células cultivadas con medio condicionado frente a las cultivadas con medio no condicionado en la placa de 96 pocillos en el ensayo de contacto indirecto.

Tras cuantificar mediante el lector de placas la absorbancia obtenida en el **ensayo de adhesión** (Figura 13), se observó una reducción del 50% de la adhesión en el dispositivo BTF comparándolo con la placa de 96 pocillos. Este resultado no es sorprendente, ya que en el dispositivo BTF las células están creciendo sobre una

membrana porosa en lugar de en una superficie plana, como ocurre en la placa de 96 pocillos. Estos resultados, además, explicarían la reducción observada en el ensayo directo, siendo una consecuencia de esta reducción una menor adhesión, más que un efecto tóxico ejercido por el BTF.

Por otro lado, en el caso del modelo de piel que se pretende estudiar, no debería de haber ningún problema con la adhesión ya que los fibroblastos se siembran embebidos en la matriz de colágeno y no directamente sobre la membrana del pocillo.

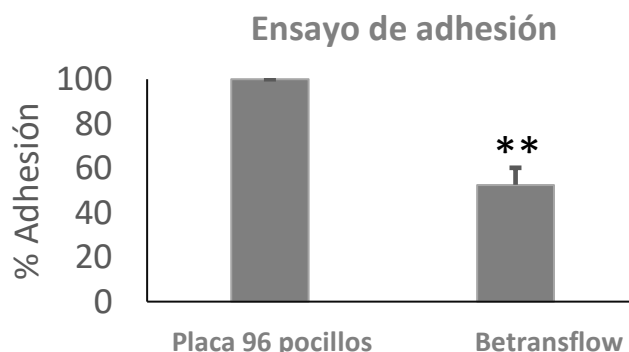


Figura 13. Comparación de la viabilidad celular entre la placa de 96 pocillos y el dispositivo Betransflow en el ensayo adhesión.

5.2. Optimización de densidades de queratinocitos (HaCaT) y fibroblastos (HDF) para el modelo de piel

5.2.1. Optimización de la densidad de HDF

Como se ha mencionado anteriormente, los fibroblastos tienen potencial contráctil y pueden producir la contracción del hidrogel de colágeno en el que están embebidos, provocando el despegue de este del pocillo del chip. Este fenómeno conlleva a que el medio de cultivo procedente del canal pase a la parte superior del pocillo central donde se encuentran las células, impidiendo la formación de la interfaz aire-líquido. Por ello, es necesario determinar la correcta densidad de fibroblastos en el hidrogel a sembrar en el pocillo del chip, que debe tener una superficie plana y no debe despegarse del pocillo.

Se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia Leica Thunder tras 14 días de siembra de los diferentes pocillos sembrados a las diferentes densidades de HDF embebidos en el hidrogel. No hay datos de los HDF sembrados a una concentración de 4×10^5 cel/ml. Como esta densidad es la más alta de todas, a los 6 días de siembra se produjo la contracción del hidrogel que se observaba a simple vista.

Las figuras 14 A y 14 B, en 3D y 2D, respectivamente, muestran los HDF sembrados a una concentración de 2×10^5 cel/ml. Tras 14 días de siembra la distribución de los fibroblastos fue homogénea dentro del hidrogel. Además, como muestra la tinción con calceína (en verde), la mayoría de las células eran viables. Sin embargo, con esta densidad, se produjo la contracción del hidrogel. En la imagen 14 A, señalado con flechas azules, se observan huecos en los que no hay células, indicativo de la contracción del hidrogel producida por el potencial contráctil de los HDF sembrados en él.

En el trabajo de Schoop y colaboradores realizaron experimentos en los que sembraron diferentes densidades de HDF. Una de ellas fue **2×10^5 cel/ml**, con la que también obtuvieron contracción del hidrogel (Schoop et al., 1999).

Las figuras 14 C y 14 D muestran el hidrogel de colágeno sembrado a una densidad de **3×10^4 cel/ml**. A esta concentración no se produjo el despegue hidrogel-pocillo durante la duración del experimento. En la imagen tridimensional (Figura 14 C) se pueden observar los HDF distribuidos a lo largo de todo el hidrogel. Al igual que en el caso anterior, la viabilidad celular fue alta, ya que apenas se observan HDF teñidos de rojo (IP).

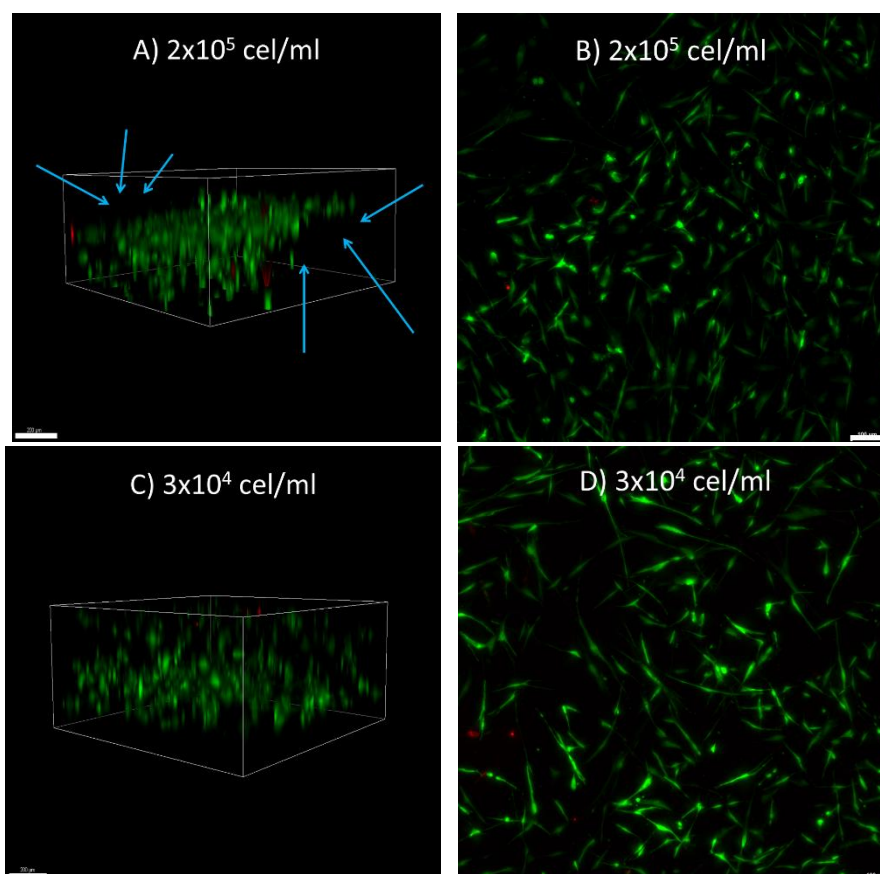


Figura 14. Fotografías tomadas con el microscopio de fluorescencia donde se muestran en verde los fibroblastos viables (calceína) y en rojo los no viables (IP) tras 14 días de cultivo. A) Reconstrucción 3D de los fibroblastos embebidos en el hidrogel de colágeno en el pocillo del chip a una densidad de 2×10^5 cel/ml. Las flechas azules indican las zonas del hidrogel contraídas por los fibroblastos. B) Suma de imágenes tomadas a lo largo de toda la altura del hidrogel con fibroblastos a una densidad de 2×10^5 cel/ml. C) Reconstrucción 3D de los fibroblastos embebidos en el hidrogel de colágeno en el pocillo del chip a una densidad de 3×10^4 cel/ml. D) Suma de imágenes tomadas a lo largo de toda la altura del hidrogel con fibroblastos a una densidad de 3×10^4 cel/ml. Barra de escala para A y C corresponde con 200 μ m. Barra de escala para B y D corresponde con 100 μ m.

Tras 14 días de siembra, los HDF presentaban una morfología celular similar a la observada en los cultivos celulares, donde los fibroblastos muestran proyecciones citoplasmáticas que les confiere su morfología fusiforme alargada característica (Figura 14, B y D).

5.2.2. Optimización de la densidad de queratinocitos

Se determinó también la densidad óptima de los queratinocitos para formar una monocapa sobre la superficie plana del hidrogel. Al igual que en el caso anterior, se

tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia tras 14 días de siembra de los diferentes pocillos con diferentes concentraciones de queratinocitos.

En Figura 15 se muestra un pocillo entero sembrado a una densidad de **2×10^7 cel/ml** después de 14 días de cultivo. Tras 24h de siembra, se observó un gran número de *clusters* repartidos a lo largo de los pocillos (no mostrado). Tras 4 días de experimento, se generó y se mantuvo la interfaz aire-líquido exitosamente durante toda la duración del experimento.

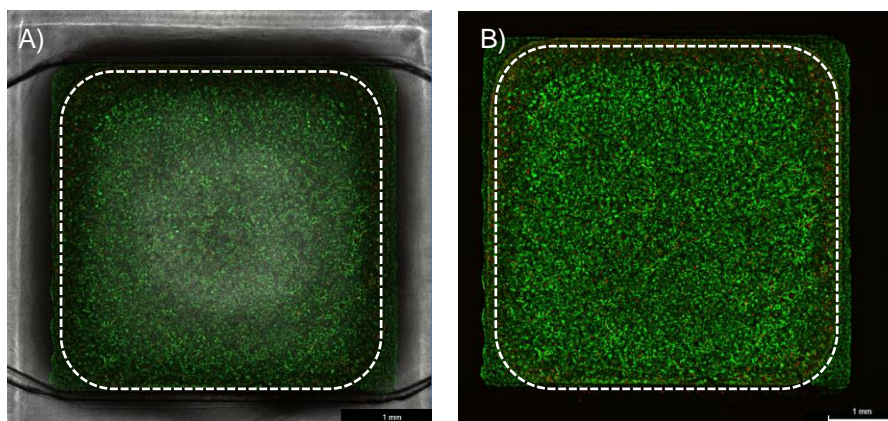


Figura 15. Fotografías tomadas con el microscopio de fluorescencia donde se observa el pocillo entero bordeado con líneas discontinuas blancas. Estas imágenes son el resultado de la reconstrucción de diferentes imágenes tomadas a 5X a lo largo de todo el pocillo. Se muestran los resultados de los queratinocitos sembrados a una densidad de 2×10^7 cel/ml tras 14 días de siembra, en verde los queratinocitos viables (calceína) y en rojo los no viables (IP).

Los queratinocitos sembrados a una densidad de **6×10^6 cel/ml** (Figura 16 C), tras 24h de experimento, se encontraban bien distribuidos a lo largo del pocillo formando algunas agrupaciones (*clusters*) en el centro del pocillo (no mostrado). Al cuarto día de experimento, se generó la interfaz aire-líquido, pero no pudo ser mantenida. Después de 14 días de cultivo, los *clusters* centrales desaparecieron y la interfaz seguía sin formarse.

Las células HaCaT sembradas a una densidad de **$1,5 \times 10^7$ cel/ml**, tras 24h de siembra se observaron varios *clusters* distribuidos a lo largo del pocillo (no mostrado), pero, tras los 14 días de experimento, las células estaban distribuidas uniformemente en el pocillo (Figura 16 B). Al cuarto día de experimento, no se generó la interfaz aire-líquido con éxito, ya que se volvían a rellenar de medio de cultivo los pocillos del chip desde los canales, debido a que la monocapa celular formada no era completa.

En la Figura 16 podemos observar la morfología y distribución de las células. A una densidad de **6×10^6 cel/ml**, las células están separadas y son fácilmente identificables (Figura 16 C). Por el contrario, las células sembradas a una densidad de **2×10^7 cel/ml** y de **$1,5 \times 10^7$ cel/ml** parecen estar más agrupadas y conectadas entre sí, formando una capa continua en la que es difícil encontrar los bordes celulares (Figura 16 A y 16 B).

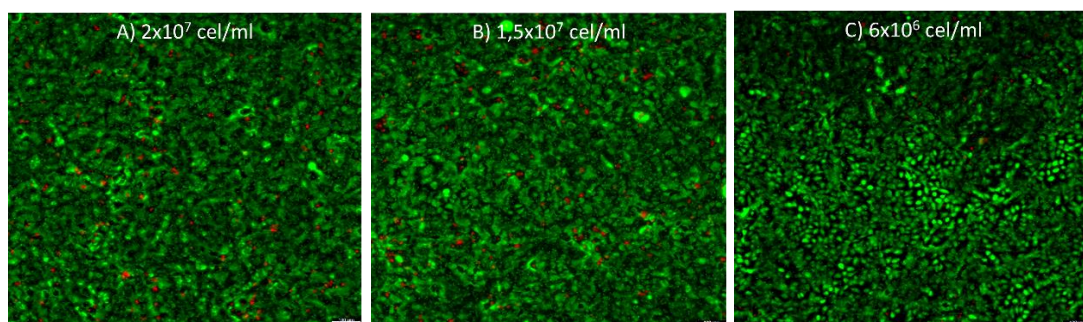


Figura 16. Morfología y viabilidad de los queratinocitos, la imagen A corresponde a una densidad de 2×10^7 cel/ml, la imagen B a una de $1,5 \times 10^7$ cel/ml y la imagen C a una de 6×10^6 cel/ml tras 14 días de siembra. En verde se muestran las HaCaT viables (calceína) y en rojo las no viables (IP). Las fotografías fueron tomadas en el centro del pocillo con el microscopio de fluorescencia. La barra de escala corresponde con $100 \mu\text{m}$.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se puede deducir que la densidad óptima de fibroblastos es 3×10^4 cel/ml, ya que con esta densidad no se produce la contracción del hidrogel. Respecto a los queratinocitos, la concentración óptima es 2×10^7 cel/ml, donde se genera una monocapa continua bien formada, promoviendo las uniones célula-célula que favorecen la preservación de la interfaz aire-líquido al impedir que el medio de cultivo del canal inferior se filtre al pocillo.

La línea celular HEKa (Human Epidermal Keratinocyte, adult) es una línea primaria de queratinocitos que representa mejor el modelo de piel, ya que estas células tienen mayor capacidad de diferenciación para la formación de los diferentes estratos, formando capas más gruesas. No obstante, al ser una línea primaria, las HEKa presentan un número de pases limitado, lo cual no es lo más adecuado para facilitar la optimización inicial de este tipo de estudios. En este trabajo, se han empleado células HaCaT porque son una línea celular inmortalizada, su tasa de proliferación es mayor y permiten la expansión y disponibilidad de un gran número de células en cortos periodos de tiempo (Schoop et al., 1999). Además, al ser una línea inmortal, no presenta un número de pases limitados, lo cual es una ventaja para estudios preliminares de caracterización. Por otro lado, la línea HaCaT requiere de un mantenimiento más sencillo, ya que estas células son cultivadas con un medio de cultivo con antibiótico, al contrario que las células Heka, evitando así posibles contaminaciones.

5.3. Histología de la dermis y epidermis

Tras realizar cortes histológicos de las muestras descritas anteriormente con un criostato Leica CM1850 y teñirlas posteriormente con hematoxilina-eosina, se observaron al microscopio óptico con la finalidad de estudiar la morfología y organización celular de dichos cortes, comparando si el modelo creado artificialmente se asemeja a la piel humana.

En las diferentes secciones transversales de cultivos de fibroblastos sembrados a las densidades 3×10^4 cel/ml y 2×10^5 cel/ml (Figura 17) se pueden ver los fibroblastos (en rosa oscuro, rodeado de negro en la imagen 17 A) embebidos en la matriz de colágeno (en rosa claro).

En la imagen 17 A, a una densidad de 3×10^4 cel/ml, se observa una cantidad menor de fibroblastos que en la de 2×10^5 cel/ml (imagen 17 B), en concreto 3 fibroblastos. Este número tiene sentido con esta densidad, ya que en el pocillo hay $1,5 \times 10^3$ fibroblastos

uniformemente sembrados en el hidrogel de colágeno de alrededor de 5000 μm de espesor y los cortes histológicos de este son de 10 μm .

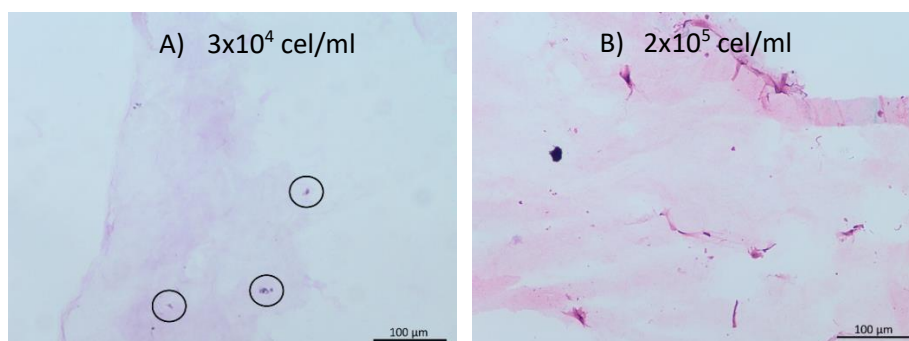


Figura 17. Imagen tomada con el microscopio óptico a 10X. Se muestra el corte histológico de fibroblastos sembrados en un hidrogel de colágeno teñidos con HE. La imagen A corresponde a una densidad de fibroblastos de $3 \times 10^4 \text{ cel/ml}$ y la imagen B a una densidad de $2 \times 10^5 \text{ cel/ml}$. En la imagen A se muestran los HDF rodeados de negro. La barra de escala corresponde con 100 μm .

También se realizaron cortes transversales de cultivos de queratinocitos sembrados a diferentes densidades $2 \times 10^7 \text{ cel/ml}$, $1,5 \times 10^7 \text{ cel/ml}$, y $6 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (Figura 18). Se analizaron 6 imágenes de diferentes cortes histológicos sembrados a diferentes densidades. Con la mayor cantidad de células, $2 \times 10^7 \text{ cel/ml}$, se obtuvo un grosor medio de la monocapa epidérmica de $29,45 \mu\text{m} \pm 2,31$ (Figura 18 A). Las dimensiones de la monocapa han sido cuantificadas con FIJI (Is Just ImageJ).

En el corte histológico de los queratinocitos sembrados a una densidad de $1,5 \times 10^7 \text{ cel/ml}$ (Figura 18 B), se obtuvo un grosor medio de la monocapa de $14,42 \mu\text{m} \pm 1,53$. En el caso del corte histológico de los queratinocitos sembrados a la menor densidad, $6 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (Figura 18 C), la monocapa es más fina que las anteriores, con un grosor medio de $9,63 \mu\text{m} \pm 1,76$.

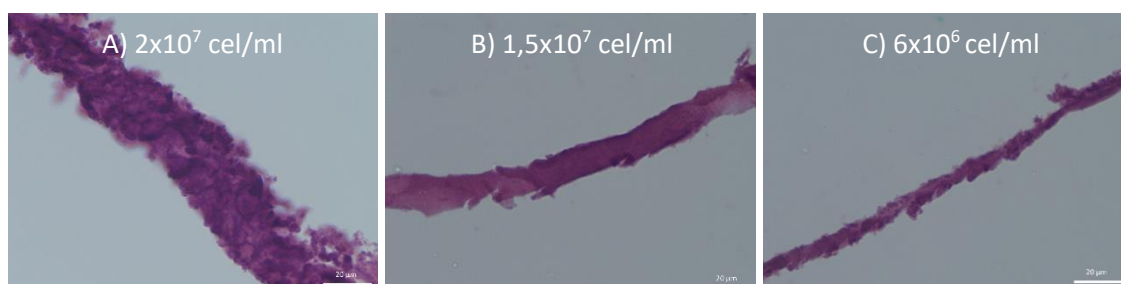


Figura 18. Imagen realizada con el microscopio óptico a 40X donde se muestran queratinocitos teñidos con HE. En la imagen A los queratinocitos están sembrados a una densidad de $2 \times 10^7 \text{ cel/ml}$, en la imagen B y C a una densidad de $1,5 \times 10^7 \text{ cel/ml}$ y de $6 \times 10^6 \text{ cel/ml}$, respectivamente. La barra de escala corresponde con 20 μm .

Según los resultados obtenidos por Ponec y colaboradores, el modelo de permeabilidad de Epiderm, tiene un grosor comprendido entre 28-43 μm , el modelo Episkin de irritación entre 24-69 μm y el de permeabilidad entre 38-48 μm de grosor y el modelo SkinEthic presenta un grosor entre 23-59 μm (Ponec et al., 2002). El espesor de estos modelos es muy semejante al de los cortes histológicos sembrados con una cantidad de $2 \times 10^7 \text{ cel/ml}$, con un grosor medio de $29,45 \mu\text{m} \pm 2,31$ de este trabajo.

6. CONCLUSIONES

Es importante evaluar la biocompatibilidad del dispositivo BTF, siguiendo la norma ISO 10993-5, sembrando los fibroblastos L929 sobre el chip. En el caso que el dispositivo BTF fuera tóxico para las células no se podría realizar sobre estos los modelos de piel. De estos ensayos se puede concluir que:

- El dispositivo microfluídico BTF no produce citotoxicidad sobre las células sembradas en él.
- La adhesión celular en las condiciones de tiempo estipuladas por la norma es de un 50% por debajo de la condición control para el dispositivo microfluídico.

Respecto a la optimización de las densidades tanto de queratinocitos como de fibroblastos para el modelo de piel a recrear en el chip se puede concluir que:

- La densidad óptima de queratinocitos es de **2×10^7 cel/ml**, ya que con esta se forma una monocapa continua e impermeable.
- La densidad óptima de fibroblastos es de **3×10^4 cel/ml**. Estos se distribuyen uniformemente en el hidrogel de colágeno sin producir su contracción, recreando la dermis.

Mediante los cortes histológicos con el criostato se puede concluir que:

- La distribución de los fibroblastos es uniforme en el hidrogel de colágeno a las diferentes densidades testadas.
- La densidad de siembra de queratinocitos (HaCaT) de **2×10^7 cel/ml** presenta un grosor similar al de modelos comerciales de piel.

El desarrollo de un modelo de tejido *in vitro* es un proceso costoso en tiempo y recursos. Este trabajo fin de grado constituye una primera aproximación al modelo ajustando las técnicas de cultivo celular conocidas por el grupo a la tecnología Organ on Chip enfocada en piel.

Es esperable que, gracias a la optimización de este modelo *in vitro*, se pueda reducir considerablemente la experimentación animal, y que los resultados obtenidos del modelo sean extrapolables al ser humano. El modelo se verá mejorado en el futuro tras sustituir las células HaCaT por HEKa y realizar el co-cultivo de queratinocitos (epidermis) sobre fibroblastos embebidos en hidrogel (dermis). Además, con la implantación de flujo a lo largo de los canales del dispositivo BTF, se irá refrescando el medio de cultivo, simulando la función de los vasos sanguíneos que irrigan la piel humana, capaces de retirar desechos y suministrar nutrientes.

CONCLUSIONS

It is important to evaluate the biocompatibility of the BTF device, following the ISO 10993-5 standard, seeding the L929 fibroblasts on the chip. In the case that the BTF device were toxic to cells, the skin models could not be performed on these. From these tests it can be concluded that:

- The BTF microfluidic device does not produce cytotoxicity on the cells seeded in it.
- Cell adhesion under the time conditions stipulated by the standard is 50% below the control condition for the microfluidic device.

Regarding the optimization of the densities of both keratinocytes and fibroblasts for the skin model to be recreated on the chip, it can be concluded that:

- The optimal cell density of keratinocytes is **2×10^7 cells/ml**, due to the fact that it forms a continuous and impermeable monolayer.
- The optimal cell density of fibroblasts is **3×10^4 cells/ml**. These are evenly distributed in the collagen hydrogel without causing its contraction, recreating the dermis.

Through the histological sections with the cryostat, it can be concluded that:

- The fibroblast distribution is uniform in the collagen hydrogel at the different densities tested.
- The keratinocyte seeding density (HaCaT) of **2×10^7 cells/ml** presents a thickness similar to the commercial skin models. Developing an *in vitro* tissue model is a time and resource costly process. This final degree project constitutes a first approach to the model, adjusting the cell culture techniques known to the group to the Organ on Chip technology focused on skin.

It is expected that, thanks to the optimization of this *in vitro* model, animal experimentation can be considerably reduced, and that the results obtained from the model can be extrapolated to humans. The model will be improved in the future after replacing HaCaT cells with Heka and perform the co-culture of keratinocytes (epidermis) on fibroblasts embedded in hydrogel (dermis). In addition, with the implantation of flow along the channels of the BTF device, the culture medium will be refreshed, simulating the function of the blood vessels that irrigate the human skin, capable of removing waste and supplying nutrients.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Armengot-Carbo, M., Hernández-Martín, Á., & Torrelo, A. (2015). Filagrina: papel en la barrera cutánea y en el desarrollo de patología. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 106(2), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2013.10.019>
- Benny, P., Badowski, C., Birgitte Lane, E., & Raghunath, M. (2016). Improving 2D and 3D skin in vitro models using macromolecular crowding. *Journal of Visualized Experiments*, 114, 1–11. <https://doi.org/10.3791/53642>
- Buendía Eisman, A., Mazuecos Blanca, J., & Camacho Martínez, F. (2018). Anatomía y fisiología de la piel. *Manual de Dermatología*, 1, 3–27.
- Campbell, K. L., & Lichtensteiger, C. A. (2016). Structure and Function of The Skin. In *Small Animal Dermatology Secrets*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-56053-626-0.50005-7>
- Dorado, J. G., & Fraile, P. A. (2021). Anatomía y fisiología de la piel. *Pediatría Integral*, 25(3), 156.e1-156.e13.
- Ferraro, S. (n.d.). *Reacción del MTT. Scientist diagram*. Retrieved September 8, 2021, from https://www.researchgate.net/figure/Figura-12-Reaccion-del-MTT-El-MTT-es-reducido-por-las-succionildeshidrogenasas_fig10_312231377
- Fibroblasto | NHGRI. (n.d.). Retrieved May 2, 2021, from <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fibroblasto>
- Fina, B. L., Lombarte, M., & Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actualizaciones En Osteología*, 9(3), 294–299.
- Jung, M. H., Jung, S. M., & Shin, H. S. (2016). Co-stimulation of HaCaT keratinization with mechanical stress and air-exposure using a novel 3D culture device. *Scientific Reports*, 6(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep33889>
- Khavkin, J., & Ellis, D. A. F. (2011). Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 19(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>
- Martínez-Hidalgo, M. P. V. (2007). *ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTATION IN TOXICOLOGY: PRESENT SITUATION.*, 13(1), 41–52. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=35215136&lang=es&site=ehost-live>
- MatTek Life Sciences. (n.d.). *EpiDerm Data Sheet Pre-Validation Histology of EpiDerm*.
- Meruane, M., & Rojas, M. (2012). Desarrollo de la Piel y sus Anexos en Vertebrados. *Int. J. Morphol*, 30(4), 1422–1433. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400025>
- Navarrete Franco, G. (2003). Histología de la piel. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 46(4), 130–133.
- Netzlaff, F., Lehr, C. M., Wertz, P. W., & Schaefer, U. F. (2005). The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>

- Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S., & Mommaas, M. (2002). Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15(SUPPL. 1), 4–17. <https://doi.org/10.1159/000066682>
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Pruniéras, M., Régnier, M., & Woodley, D. (1983). Keratinocytes Air Liquid Interface. *The Journal of Investigative Dermatology*, 81(1).
- Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., De Lucca, M., Ruano, A., García-Barceló, M., Rivera-Cervantes, M., García-Rodríguez, J., & Sánchez-Mateos, S. (2016). The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(2), 288–299. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2169>
- Schoop, V. M., Mirancea, N., & Fusenig, N. E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCat keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(3), 343–353. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x>
- Technology | BEOnChip – Biomimetic Environment On Chip. (n.d.). Retrieved September 1, 2021, from <https://beonchip.com/technology/>
- Top differences between human and animal skin | Genoskin. (n.d.). Retrieved September 7, 2021, from <https://genoskin.com/blog/2020/03/04/human-vs-animal-skin/>
- Tracy, L. E., Minasian, R. A., & Caterson, E. J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care*, 5(3), 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0561>
- Zhu, Y. K., Umino, T., Liu, X. D., Wang, H. J., Romberger, D. J., Spurzem, J. R., & Rennard, S. I. (2001). Contraction of fibroblast-containing collagen gels: Initial collagen concentration regulates the degree of contraction and cell survival. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 37(1), 10–16. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2001\)037<0010:COFCCG>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2001)037<0010:COFCCG>2.0.CO;2)

8. ANEXOS

Anexo I. Fórmulas para calcular el volumen necesario de cada reactivo para la realización de hidrogeles de colágeno.

$$V_{colágeno} = \frac{V_f C_f}{C_{stock}}$$

$$V_{NaOH} = \frac{1}{40} V_{colágeno}$$

$$V_{DMEM5x} = \frac{1}{10} V_f$$

$$V_{dH_2O} = \frac{1}{2} V_f - (V_{colágeno} + V_{NaOH} + V_{DMEM5x})$$

$$V_{Medio} = \frac{1}{2} V_f$$